DOI:10.13523/j.cb.20170714

技术与方法

位点特异整合微环 DNA 的体内制备*

聂永强[1] 马海燕[1,2] 马晴雯[1,2]**
(1 上海交通大学附属儿童医院 上海市儿童医院 上海交通大学医学遗传研究所 上海 200040)
(2 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室暨上海市胚胎与生殖工程重点实验室 上海 200040)

摘要 目的:应用诱导表达的 LR 克隆酶系统,建立一种在细菌体内获得基于链霉菌噬菌体 ΦC31 整合酶系统的位点特异整合型微环 DNA 的方法,为实现无细菌骨架等冗余序列的转基因奠定基础。方法:构建包含阿拉伯糖启动子的 LR 克隆酶系统和 ΦC31 整合酶系统的亲本质粒,在 L-阿拉伯糖的诱导下重组产生表达 ΦC31 整合酶的微质粒和包含有目的基因和 attB 位点等元件的微环 DNA。以限制性内切核酸酶酶切电泳定性其重组效率,qPCR 定量分析微环、微质粒及亲本质粒的比例,定量计算重组效率。观察随着诱导时间的推进微环/微质粒值的变化。结果:细菌体内 LR 克隆酶系统可有效催化亲本质粒的重组,重组率达 85% 以上。相比商品化 LR 克隆酶体外反应具有更高的稳定性而且更经济。结论:获得了一种高效、稳定的细菌体内产生位点特异性整合型微环 DNA 的亲本质粒。

关键词 微环 DNA LR 克隆酶系统 位点特异性整合 阿拉伯糖启动子 ΦC31 整合酶
中图分类号 Q78

微环 DNA 为非病毒、染色体外的、共价闭合的环状基因表达载体,通常在重组细菌中合成,具有满足临床治疗的安全性和长期基因表达所需的简约骨架[1]。由于微环 DNA 一般不整合入基因组,在静息或活跃分裂的细胞中有较高的安全性,亦可实现持续的转基因表达,因此被认为是一种理想的非病毒载体[2]。虽然介导基因转移的病毒型载体通常较非病毒型载体具有较高的整合效率,但其安全性一直备受担忧;因此,在转基因动物制备中,上述两类载体目前都无法将安全性和整合效率兼顾。而近来研究较热的基因编辑利器 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统,在特异位点的针对性编辑上表现出色,但 TALEN 的相对较低的重组效率、CRISPR/Cas9 的脱靶效应也一直是其有待改善之处。链霉菌噬菌体 ΦC31 整合酶在哺乳动物细胞内能有效介导携带链霉菌 attB 序列的外源基因与哺乳动物基因组"假 attP"位点发生高效重组,实现外源基因位点特异性整合[3],且重组反应不可逆,每个细胞往往为单拷贝的基因整合[4],可以有效地降低外源基因整合的随机性和高风险位点整合带来的安全隐患。但 ΦC31 整合酶系统介导的整合最大的缺点就是整个质粒都会整合到细胞基因组中,由此插入了大量的细菌骨架序列。因此,若能制备基于 ΦC31 整合酶系统的微环 DNA,则有望避免细菌骨架等冗余序列的插入。除了传统的阿拉伯糖诱导重组酶(如 Cre 重组酶、ParA 解离酶、ΦC31 整合酶等)表达[5-7]来介导其识别位点重组制备微环 DNA 外,LR 克隆酶也可用于微环 DNA 的制备[8]。该酶是由 Invitrogen 公司提供的一种商品化酶混合物,可介导 λattL 和 λattR 之间的重组生成 λattB 和 λattP,是一种由 λ 噬菌体整合酶(Int)、切割酶(Xis)和细菌体内整合宿主因子(IHF)共同发挥作用的重组系统[9-10]。但上述几种方法均需在重组后将微环 DNA 回收纯化[5-8],价格昂贵、费时、费力、得率低。针对这些问题,本研究室在前期研究中利用 LR 克隆酶体外制备了基

收稿日期:2017-03-06 修回日期:2017-05-29
* 上海市卫生局青年基金资助项目(20154Y0152)
**通讯作者,电子信箱:maqingwen@hotmail.com

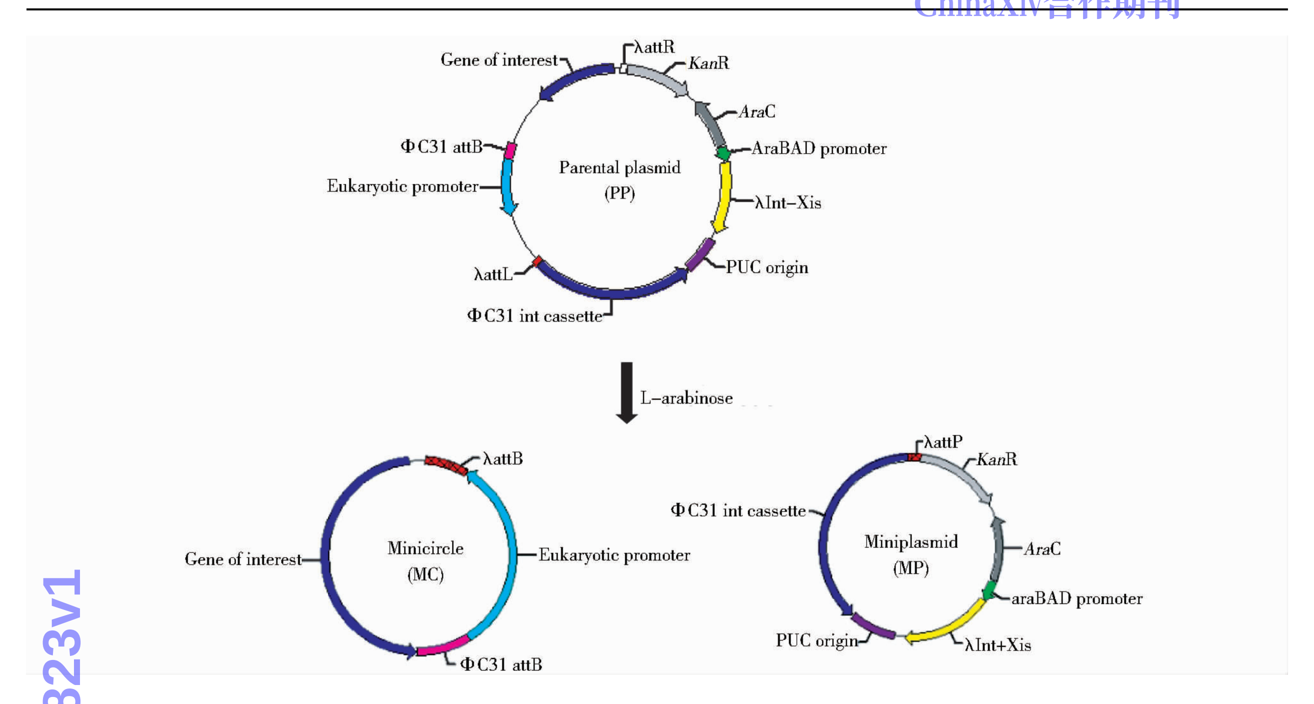


图 1　微环 DNA 制备示意图

Fig. 1　Schematic diagram of minicircle DNA preparation

于 ΦC31 整合酶系统的位点特异整合型微环 DNA,大大节省了操作步骤和时间,获得了稳定表达的细胞株[11-12]。然而,体外制备微环 DNA 使用的商品化 LR 克隆酶价格昂贵且活性不稳定,因此,本研究将 LR 克隆酶基因表达框引入亲本质粒,使用阿拉伯糖诱导启动子驱动 LR 克隆酶的表达(图 1),建立了一种在细菌体内快捷、高效地获得基于 ΦC31 整合酶系统的位点特异整合型微环 DNA 的方法,进一步节省了微环 DNA 的制备步骤和时间,降低了实验成本,为扩大微环 DNA 的应用范围奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　细胞与质粒　质粒 MF-PP[11] 为本所构建保存;含有 λ 噬菌体整合酶和切割酶基因的 λ-*Hind* III 购自 Fermentas 公司;质粒 pBCPB + 和质粒 pInt 由 Prof. MP Calos 惠赠[12];含阿拉伯糖启动子的质粒 pBAD/myc-HisA 购自 Invitrogen 公司;质粒 pEGFP-PP[13] 为本所构建保存;大肠杆菌 DH10B 为本所保存;大肠杆菌 TOP10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.2　主要试剂　Ex-Taq 酶和 pMD19-T 载体购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 Q5 超保真酶购自美国 NEB 公司;SYBR® 荧光定量 PCR 试剂购自美国 Roche 公司;PCR 纯化试剂盒和胶回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司;质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;L-阿拉伯糖购自美国 Sigma 公司;LR 克隆酶购自美国 Invitrogen 公司;引物(表 1)由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2　方　法

1.2.1　目的片段的获得　设计引物 LR-F 和 LR-R 以 λ-*Hind* III DNA 为模板扩增获得 λ 噬菌体整合酶和切割酶基因(λint + Xis 片段,为方便起见,本文将其统称为 LR 克隆酶);设计引物 Ara-F 和 Ara-R 以质粒 pBAD/myc-HisA 为模板获得阿拉伯糖启动子(AraC-araBAD 片段);以质粒 pEGFP-PP 为模板设计引物 λattL-F 和 λattL-R 获得 λattL,设计引物 λattR-F 和 λattR-R 获得 λattR;设计引物 Adaptor-F 和 Adaptor-R 获得接头 Adaptor(上述引物序列见表 1)。

1.2.2　验证质粒的获得　*Sal* I 和 *Hind* III 双酶切 λattL 片段,插入到质粒 pBCPB + 的 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切位点获得质粒 pBCLP;*Spe* I 酶切 λattR 片段,插入到质粒 pBCLP 的 *Spe* I 位点间,获得验证质粒 pBCLR,该质粒的 λattL 片段和 λattR 片段之间为 *LacZ* 基因,能够采用蓝白斑实验在细菌体内验证 LR 克隆酶的重组作用。

1.2.3　亲本质粒的获得　在质粒 pInt 酶切位点 *Bam*H I 和 *Spe* I 之间插入 λInt + Xis 片段(*Bam*HI 和 *Bgl* II 为

表 1 PCR 和定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequences (5′-3′)
LR-F	AGATCTCCTGAGGTTATTTGATTTCAAT
LR-R	ACTAGTATGTACTTGACACTTCAGGAGTG
Ara-F	AGAGCTCCTCAGGATTATGACAACTTGA
Ara-R	GCACTAGTAACAGTAGAGAGTTGCGATAA
λattL-F	CGAGTCGACATGTCAAATAATGA
λattL-R	CGCAAGCTTAATATAGCCTGCTT
λattR-F	GGCGCTCGAGAAGTACTAGTACA
λattR-R	GGACTAGTCATAGTGACTGGATATGT
Adaptor-F	CGGCCAAGCTTCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
Adaptor-R	CGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAAATTAGTCAGCCATGAAGCTTGGCCGCCG
A	GGCGAGAAAGGAAGGGAAGA
B	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
λattP-F	TGCCCGCTTTCCAGTC
λattP-R	CATTTTACGTTTCTCGTTCAG
λattB-F	TAACTTCGTATAATGTATGCTA
λattB-R	GGCTATGAACTAATGACC
λattP-F	TGCCCGCTTTCCAGTC
λattB-R	GGCTATGAACTAATGACC
MPS-F	GGGTGCCTAATGAGTGAGC
MPS-R	CCGATTGTCTGTTGTGCC
MCS-F	TTGGAGAAACAGCAACCCAT
MCS-R	CCACTACCAGCAGAACACCC

同尾酶)获得质粒 pXis,在质粒 pXis 酶切位点 *Sac* I 和 *Spe* I 之间插入 AraC-araBAD 片段获得质粒 pXis. Ara,其中 λInt + Xis 的表达受阿拉伯糖启动子的驱动。内切酶 *Sfi* I 酶切质粒 MF-PP,回收含有卡那霉素抗性基因、复制起始位点元件的 2.7kb 片段与 Adaptor 连接得到质粒 pYqI。内切酶 *Bsu*36 I 酶切 pXis. Ara,得到含有 λInt + Xis 和 AraC-araBAD 的 2.5kb 片段。正向连入 pYqI 的 *Bsu*36 I 酶切位点得到质粒 pYqII。内切酶 *Sfi* I 酶切质粒 pYqII 得到的 5.2kb 片段连接到 MF-PP 的 *Sfi* I位点之间得到亲本质粒 pMF. LA。

1.2.4 LR 克隆酶基因功能验证 质粒 pXis 转化大肠杆菌 DH10B 感受态得到 DH10BIX 大肠杆菌,将此菌制成感受态,质粒 pBCLR 转化大肠杆菌 DH10BIX 感受态得到 DH10BIXLR 大肠杆菌,在氯霉素、卡那霉素双抗性培养基平板培养并进行蓝白斑实验,随机挑取 8 个白斑设计引物 A 和 B 进行菌落 PCR 验证删除效率,实验重复三次;另质粒 pBCLR 转化大肠杆菌 DH10B 感受态在氯霉素抗性平板上进行蓝白斑实验作为对照。引物设计:λattL 上游设计正向引物 A、λattR 下游设计反向引物 B(引物序列见表 1);若发生 LR 重组反应则会扩增出 220bp 的条带,反之,则会扩增出 4kb 的条带,PCR 反应条件如下:94℃ 10min 变性,94℃ 30s、60℃ 30s、72℃ 4min 每个循环退火温度降 1℃共 15 个循环,94℃ 30s、45℃ 30s、72℃ 4min 共 16 个循环,72℃ 8min。

1.2.5 亲本质粒体内 LR 重组效率测定 将指数期生长的大肠杆菌以 1:10 稀释接种到 10ml 的 LB 培养基中(卡那霉素 60μg/ml, L-阿拉伯糖 3mg/ml),220r/min、30℃培养,测量诱导 2h、4h、6h、8h、10h、12h、16h、24h 不同时间段的重组效率。提取质粒以 *Sal* I 酶切质粒 pMF. LA 的 LR 重组产物来鉴定重组反应的发生:若发生重组,得到 10.4kb 的微环 DNA(minicircle DNA, MC,本文中命名为 MF. LA-MC)和 7.8kb 的微质粒

(miniplasmid,MP,本文中命名为 MF. LA-MP);若未发生重组,则亲本质粒(parental plasmid, PP)pMF. LA 被切成 3.1kb 和 15.1kb 两条带。

同时,应用荧光定量 PCR 方法检测诱导时间为 2h、4h、6h、8h、10h 质粒的拷贝数,可较为准确地计算三种质粒(MC、MP 和 PP)拷贝数的比例,并计算重组率。LR 反应的重组效率计算公式如下:

$$重组率(\%)=\frac{MC\ 拷贝数}{PP\ 拷贝数+MC\ 拷贝数}\times 100\%$$

在微环 DNA 的 λattB 上游设计引物 λattB-F、下游设计引物 λattB-R,在 λattP 上游设计引物 λattP-F、下游设计引物 λattP-R(引物序列见表 1);λattB-F 和 λattB-R 扩增微环的特有片段,大小为 160bp;λattP-F 和 λattP-R 扩增微质粒的特有片段,大小为 155bp;λattP-F 和 λattB-R 扩增亲本质粒 pMF. LA 的特有片段,大小为 179bp。另外,以 MF. LA-MP 为模板在 λattP-F 上游设计引物 MPS-F 和 λattP-R 下游设计引物 MPS-R(引物序列见表 1),长度为 519bp 的 PCR 产物连入 T 载体构建质粒 T-MP 以制作微质粒定量 PCR 标准曲线;以 MF. LA-MC 为模板在 λattB-F 上游设计引物 MCS-F 和 λattB-R 下游设计引物 MCS-R(引物序列见表 1),长度为 823bp 的 PCR 产物连入 T 载体构建质粒 T-MC 制作微环标准曲线;以质粒 MF-PP 为模板制作亲本质粒 pMF. LA 标准曲线。

1.2.6　体外 LR 克隆酶重组效率测定　提取 pMF. LA 质粒在体外进行 LR 重组反应,反应条件参照 LR 克隆酶说明书。反应体系如下:亲本质粒(pMF. LA)200ng,10×TE 1μl,LR 克隆酶 2μl,ddH_2O 补加到 10μl 体系。5 个独立的反应于 25℃分别反应 2h、4h、6h、8h、10h,应用荧光定量 PCR 方法通过绝对定量检测 PP 和 MC 的拷贝数,进而计算重组率,所用的引物、标准曲线模板及重组率计算公式同 1.2.5。

2　结　果

2.1　LR 克隆酶基因功能验证结果

双抗平板均为白斑,氯霉素抗性的平板均为蓝斑;常规 PCR 方法验证结果如图 2 所示,所有 8 个样品均扩增产生 220bp 片段,说明 λInt + Xis 表达,并介导质粒 pBCLR 上的 λattR 和 λattL 发生了 LR 重组反应,将两者之间的 *LacZ* 基因删除。

2.2　亲本质粒体内 LR 重组效率测定结果

阿拉伯糖诱导 2h、4h、6h、8h、10h、12h、16h、24h 对

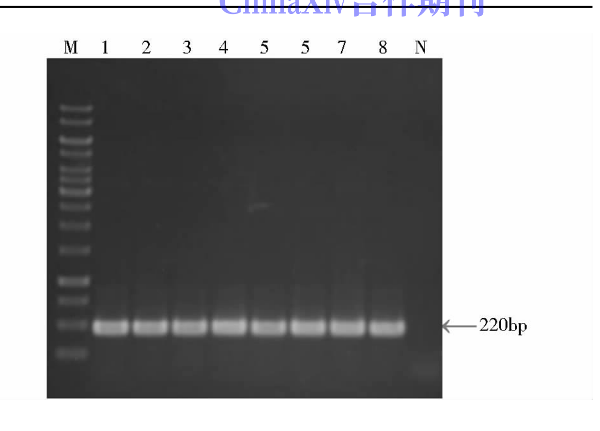


图 2　菌落 PCR 电泳结果

Fig. 2　Electrophoresis results of colony PCR

应的重组效率如图 3 所示,限制性内切核酸酶 *Sal* I 酶切得到 10.4kb 的微环 DNA,7.8kb 的微质粒,3.1kb 和 15.1kb 的亲本质粒;从图 3 中可以看出亲本质粒 3.1kb 和 15.1kb 两条带基本消失,微环 DNA/微质粒值随着时间延长越来越小,说明 LR 重组反应有效发生,而且微环 DNA/微质粒的比例随着诱导时间的变化而改变,因此,可以通过改变诱导时间来调节微环 DNA/微质粒的值。三个标准品逐级稀释后,进行荧光定量 PCR 反应;诱导 2h、4h、6h、8h、10h 不同时间绝对定量 PCR 结果如图 4 所示,LR 重组反应重组效率随着时间的延长先升高后降低,6h 时达到最高值 85%;随着诱导时间的延长,亲本质粒所占的比例越来越低,而且由于微质粒能自主复制,随着诱导时间的延长微质粒/微环的比例越来越大。

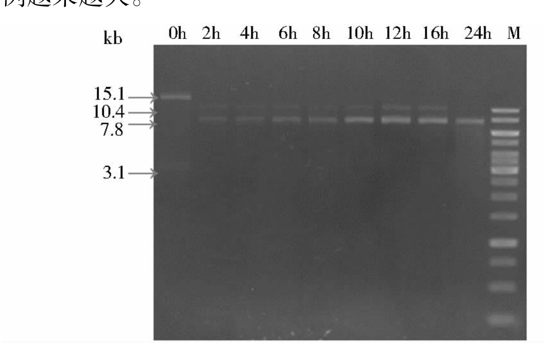


图 3　不同诱导时间重组产物 *Sal* I 酶切电泳结果

Fig. 3　Electrophoresis results of *Sal* I digestion of recombination products under different induction time

0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、16h、24h: Different induction time; M: 1kb marker

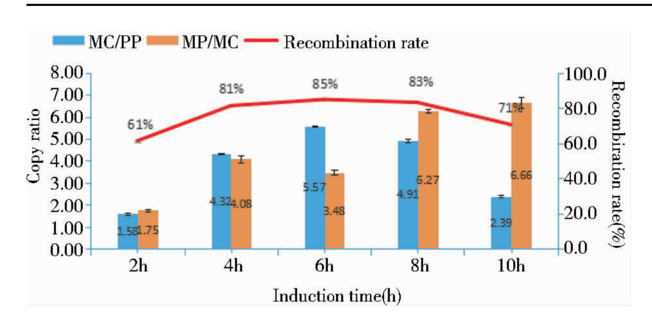


图 4　亲本质粒 pMF. LA 细菌体内 LR 重组率与时间的关系

Fig. 4　The relationship between *in vivo* LR recombination rate and time of pMF. LA

2.3　体外 LR 克隆酶重组效率测定结果

两个标准品(T-MC 和 MF-PP)逐级稀释后,进行荧光定量 PCR 反应;不同反应时间 2h、4h、6h、8h、10h 的重组效率如图 5 所示,LR 重组反应效率随着时间的延长呈有升高的趋势,但无规律可循,10h 时最高值 11.8% 。随着诱导时间的延长,重组效率并未产生较大的提高。

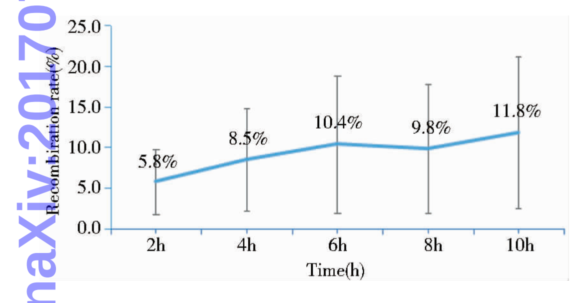


图 5　亲本质粒 pMF. LA 的体外 LR 重组率与时间的关系

Fig. 5　The relationship between *in vitro* LR recombination rate and time of pMF. LA

3　讨　论

微环 DNA 是在传统质粒的基础上通过位点特异性重组删除细菌骨架而得到的一种较亲本质粒分子质量降低的超螺旋分子,在细胞体内具有更高的转基因表达水平和安全性[7,14]。微环 DNA 的制备方法有很多,经典的微环 DNA 的制备是利用 cI857/pR 启动子[15-16]或者阿拉伯糖启动子[5-7]控制重组酶的表达,发生重组反应形成微质粒和微环 DNA,微环 DNA 需进一步纯化,与微质粒和残留的亲本质粒分离后[14]方可用于下游应用。近年来,微环 DNA 的纯化得到了许多改进[17-18],如进行菌株的改良、使用阴离子交换色谱法等。

尽管如此,微环 DNA 的纯化仍面临诸多问题。为将微环 DNA 与微质粒和亲本质粒分离,微质粒和亲本质粒通常被内切核酸酶线性化,然后通过氯化铯超速离心法分离微环 DNA,该方法得率往往较低,且需要较高的内切酶耗费和较大的人力投入[14];Chen 等[19]采用细菌体内内切核酸酶共表达的方法可以大大提高微环 DNA 的回收率,但亲本质粒残留高且耗时长,尽管进行了改进[17],但需要特定的菌株且仍存在亲本质粒的少量残留。Tasic 等[8]使用商品化 LR 克隆酶在体外发生 LR 重组反应,方便、省力;但商品化 LR 克隆酶介导的体外重组反应会有大量的亲本质粒残留,且商品化 LR 克隆酶价格昂贵、反应效率不稳定,可能是由于 Invitrogen 公司开发 LR 克隆酶的目的是为了将其应用于 Gateway Technology 系统[10],该系统中 LR 克隆酶介导的是两个分子间的 LR 重组,而非微环 DNA 制备中的分子内重组。

ΦC31 整合酶系统在哺乳动物细胞中能介导携带有 attB 序列的外源基因与哺乳动物基因组"假 attP"[20]位点发生高效重组反应,实现目的基因的位点特异性整合。利用 ΦC31 整合酶进行外源基因的位点特异性整合需要把含有 ΦC31 整合酶表达盒的质粒和含有 attB 位点的质粒共转染进入动物细胞[3]。ΦC31 整合酶系统具有诸多优点:介导含 attB 位点的质粒整合于哺乳动物基因组内"假 attP"位点的效率是随机整合的 5~10 倍[21];哺乳动物基因组中"假 attP"位点大多位于基因的非编码区[22],且外源目的基因往往为单拷贝整合[21-22];ΦC31 整合酶系统可很好地介导较大片段外源基因片段的整合[23-24],其能力优于逆转录病毒载体。但该系统介导的整合会把质粒载体上的冗余序列,如复制起始位点、抗性基因等细菌骨架序列[25],随目的基因一起插入到哺乳动物的基因组内,引起潜在的生物安全问题[25-26]。

为避免上述问题,本研究结合了 LR 克隆酶系统和 ΦC31 整合酶系统的优势,建立了一种获得位点特异性整合微环 DNA 的方法:在 L-阿拉伯糖诱导下,λ 噬菌体整合酶和切割酶表达,与细菌整合宿主因子共同发挥 LR 克隆酶系统的作用,介导亲本质粒发生 LR 重组反应,在细菌体内产生包含有目的基因和 ΦC31 整合酶所识别的 attB 位点等元件的微环 DNA 和真核生物细胞内表达 ΦC31 整合酶的微质粒。因此,LR 重组混合物中的微质粒含有 ΦC31 整合酶表达盒,而微环 DNA 含有 attB 位点,该混合物可在真核细胞中利用 phiC31 整

合酶系统实现目的基因的位点特异性整合。

利用本研究构建的亲本质粒 pMF. LA,微环的产生率可达到85%,而使用商品化的 LR 克隆酶进行体外重组,pMF. LA 的重组效率仅为11.8%左右(图5),实验采用两个不同批次的 LR 克隆酶重复了三次,发现重组效率不稳定;而使用较小的质粒,如 pEGFP-PP(7.3kb)重组效率可达85%左右[14],同本研究所测该质粒的重组率相当(数据未给出),可能是因为 LR 克隆酶识别位点 λattL 和 λattR 之间的间隔越短重组反应的效率越高,可进一步研究识别位点不同间隔长度的质粒与 LR 重组反应效率的关系;之后的研究发现,随着诱导细菌的培养体系的增大(如 10ml 增大到 200ml),pMF. LA 的 LR 重组效率可以提高至93%以上(数据未给出),可能是因为实验中培养体系和容器的增大使分子质量较大的亲本质粒的复制速率相对于分子内的重组反应效率降低,更多的亲本质粒发生重组形成微环 DNA,这将有利于微环 DNA 的扩大化生产。未来可检测溶氧、比生长速率和培养方式等因素对重组率的影响,以期进一步提高重组率。因微质粒部分可以自主复制,因此可以通过改变 L-阿拉伯糖诱导时间来调节微质粒/微环的比例,以进一步提高 ΦC31 整合酶在真核细胞介导外源基因位点特异整合的效率。研究表明,调节携带 ΦC31 整合酶表达盒的质粒与携带 attB 位点的质粒拷贝数比例到合适水平能降低随机整合的水平[27]。而且,在构建亲本质粒时预先引入 Cre/LoxP 系统,由此得到的微环 DNA 在整合入真核细胞基因组后可在 Cre 酶作用下删除 LoxP 位点间筛选基因等冗余序列[28],获得只含目的基因和启动子的转基因细胞系。微环产生过程残余的亲本质粒因分子质量大且含量低,较微环 DNA 难转染,即使亲本质粒插入基因组的"假 attP"位点,在 Cre 酶作用下同样也可以删除 LoxP 位点间的冗余序列。

综上所述,本研究建立了应用 LR 克隆酶系统在细菌体内获得微环 DNA 与含有 ΦC31 整合酶表达盒的微质粒的方法,无需分离微环 DNA 即可共转染真核细胞,从而能够经济、高效、稳定地获得位点特异性整合微环 DNA 的方法,为拓展微环 DNA 在转基因研究中的应用奠定了基础。

参考文献

[1] Maniar L E G, Maniar J M, Chen Z, et al. Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. Molecular Therapy, 2013, 21(1): 131-138.

[2] Gaspar V, de Melo-Diogo D, Costa E, et al. Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(3): 353-379.

[3] Karow M, Calos M P. The therapeutic potential of PhiC31 integrase as a gene therapy system. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(10): 1287-1296.

[4] Chalberg T W, Portlock J L, Olivares E C, et al. Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. J Mol Biol, 2006, 357(1): 28-48.

[5] Bigger B W, Tolmachov O, Collombet J M, et al. An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. J Biol Chem, 2001, 276(25): 23018-23027.

[6] Jechlinger W, Azimpour T C, Lubitz W, et al. Minicircle DNA immobilized in bacterial ghosts: *in vivo* production of safe non-viral DNA delivery vehicles. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004, 8(4): 222-231.

[7] Chen Z Y, He C Y, Ehrhardt A, et al. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. Mol Ther, 2003, 8(3): 495-500.

[8] Tasic B, Hippenmeyer S, Wang C, et al. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(19): 7902-7907.

[9] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of iambda site-specific recombination. Annual Review of Biochemistry, 1989, 58(1): 913-941.

[10] Liang X, Peng L, Baek C, et al. Single step BP/LR combined gateway reactions. BioTechniques, 2013, 55(5): 265-268.

[11] 刘浏. 位点特异整合型微环 DNA 在转基因研究中的应用. 上海:上海交通大学, 医学院,2014.
Liu L. The Application of Site-specific Integration Minicircle DNA in Transgenic Research. Shanghai:Shanghai Jiao Tong University, Medical School, 2014.

[12] Groth A C, Olivares E C, Thyagarajan B, et al. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(11): 5995-6000.

[13] 刘浏, 周在威, 马晴雯. 位点特异整合型微环 DNA 的构建及应用. 中国医药生物技术, 2014,9(1): 13-19.
Liu L, Zhou Z W, Ma Q W. An improved method to generate site-specific integration minicircle DNA. Chin Med Biotechnol, 2014, 9(1):13-19.

[14] Mayrhofer P, Schleef M, Jechlinger W. Use of minicircle plasmids for gene therapy. Methods Mol Biol, 2009, 542: 87-104.

[15] Darquet A M, Cameron B, Wils P, et al. A new DNA vehicle for

nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. Gene Ther, 1997, 4(12): 1341-1349.

[16] Nehlsen K, Broll S, Bode J. Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells-research article. Gene Therapy and Molecular Biology, 2006, 10B: 233-243.

[17] Kay M A, He C, Chen Z. A robust system for production of minicircle DNA vectors. Nature Biotechnology, 2010, 28(12): 1287-1296.

[18] Diamantino T, Pereira P, Queiroz J A, et al. Minicircle DNA purification using a CIM(R) DEAE-1 monolithic support. J Sep Sci, 2016, 39(18): 3544-3549.

[19] Chen Z Y, He C Y, Kay M A. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression *in vivo*. Hum Gene Ther, 2005, 16(1): 126-131.

[20] Bi Y, Liu X, Zhang L, et al. Pseudo attP sites in favor of transgene integration and expression in cultured porcine cells identified by Streptomyces phage phiC31 integrase. BMC Mol Biol, 2013, 14: 20.

[21] Thyagarajan B, Olivares E C, Hollis R P, et al. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. Mol Cell Biol, 2001, 21(12): 3926-3934.

[22] Chalberg T W, Portlock J L, Olivares E C, et al. Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. J Mol Biol, 2006, 357(1): 28-48.

[23] Ortiz-Urda S, Thyagarajan B, Keene D R, et al. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. Nat Med, 2002, 8(10): 1166-1170.

[24] Quenneville S P, Chapdelaine P, Rousseau J, et al. Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phi C31 integrase: Stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. Molecular Therapy, 2004, 10(4): 679-687.

[25] Jechlinger W. Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination. Expert Rev Vaccines, 2006, 5(6): 803-825.

[26] Pang A S D. Production of antibodies against Bacillus thuringiensis delta-endotoxin by injecting its plasmids. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 202(3): 1227-1234.

[27] Woodard L E, Hillman R T, Keravala A, et al. Effect of nuclear localization and hydrodynamic delivery-induced cell division on phiC31 integrase activity. Gene Ther, 2010, 17(2): 217-226.

[28] Ma B G, Duan X Y, Niu J X, et al. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/loxP recombination system with self-excision of selectable marker. Biotechnol Lett, 2009, 31(1): 163-169.

An *in vivo* Robust System for Generation of Site-specific Integration Minicircle DNA Vector

NIE Yong-qiang[1] MA Hai-yan[1,2] MA Qing-wen[1,2]

(1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China)

(2 Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health & Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China)

Abstract Objective: Transgenic technology has an important application value in the field of gene therapy, transgenic animals, genome modification and other biomedical researches. Many researches demonstrated that ΦC31 integrase system was an efficient tool for site-specific integration, but the biggest drawback of this system is the integration of the bacterial backbone in the attB donor plasmid. The minicircle DNA is an expression vector containing only the target gene, preparation of minicircle DNA based on ΦC31 integrase system is expected to avoid the introduction of bacterial backbone at the integration site, with improved biological safety of the system. The classic procedure for minicircle DNA preparation is laborious with low yield and unstable efficiency. In order to solve above problems, a feasible and effective method for obtaining site-specific integrated minicircle DNA by combining the LR clonase system and the *Streptomyces* phage ΦC31 integrase system were established, and laying

a foundation for the construction of transgenic cells without redundant sequences such as bacterial backbone. Methods: The parental plasmid containing LR clonase system and ΦC31 integrase system is constructed, it can be recombined by L-arabinose induced LR clonase in bacteria to produce a miniplasmid expressing ΦC31 integrase in eukaryotic cells and a minicircle DNA containing the original genes such as the target gene and attB site. The recombination efficiency was qualitatively analyzed by restriction endonuclease digestion and quantitatively analyzed by calculating the proportion of minicircle DNA, miniplasmid and the parental plasmid. The change of the ratio of minicircle DNA/miniplasmid was observed along with the induction time. Results: A validation plasmid and a parental plasmid for the production of site-specific integrated minicircle DNA were constructed. The LR clonase system could effectively catalyze the recombination of attL and attR in the parental plasmid in bacteria, and the recombination rate was more than 85%. Conclusion: A parental plasmid which can be recombined to generate site-specific integration minicircle DNA by L-arabinose induction in bacteria with higher and more stable efficiency when compare to the *in vitro* LR recombination were constructed, which will expand the application potential of minicircle DNA in transgenic researches.

Key words Minicircle DNA LR clonase system Site-specific integration Arabinose promoter ΦC31 integrase system